

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



550280

(43) 国際公開日
2004年10月7日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/085653 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/62, C12P 21/02, C07K 19/00, 14/44, 14/47, A61K 38/16, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003956
- (22) 国際出願日: 2004年3月23日 (23.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-081337 2003年3月24日 (24.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本医科大学 (NIPPON MEDICAL SCHOOL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1138602 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 成男 (OHTA, Shigeo) [JP/JP]; 〒1138602 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内 Tokyo (JP). 麻生 定光 (ASOH, Sadamitsu) [JP/JP]; 〒1138602 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL DEATH-INDUCING FUSED GENE ACTING SPECIFICALLY ON CANCER AND GENE PRODUCT THEREOF

(54) 発明の名称: 癌に特異的に作用する細胞死誘導融合遺伝子及びその遺伝子産物

(57) Abstract: It is intended to provide a protein having a potent effect of inducing cell death (i.e., a fused protein having a denatured Bax protein carrying GEP fused to the N-terminal and a homing signal peptide having a homing effect on cancer cells further fused in the N-terminal side); a gene encoding the fused protein; and a cancer cell proliferation inhibitor containing the fused protein. Namely, a fused gene containing a cell death-inducing gene specifically acting on cancer cells, which is a fused gene having a gene encoding a cancer cell-specific homing signal peptide sequence, a gene encoding a green fluorescent protein (GFP) and a gene encoding Δ -NBax with a deletion of the N-terminal sequence containing BH3 region of human Bax in this order, and a fused protein encoded by the fused gene.

(57) 要約: 本発明は、強力な細胞死誘導作用を有するタンパク質、すなわちGFPをN末端に融合した改変型Baxタンパク質のN末端側にさらに癌細胞へのホーミング作用を有するホーミングシグナルペプチドを融合させた融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする遺伝子、および該融合タンパク質を含む癌細胞増殖抑制剤を提供する。本発明は、癌細胞に特異的に作用する細胞死誘導遺伝子を含む融合遺伝子であって、癌細胞に特異的なホーミングシグナルペプチド配列をコードする遺伝子、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子およびヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxをコードする遺伝子をこの順番で融合させた融合遺伝子および該融合遺伝子がコードする融合タンパク質である。

WO 2004/085653 A1

明細書

癌に特異的に作用する細胞死誘導融合遺伝子及びその遺伝子産物

技術分野

本発明は、強力な細胞死誘導作用を有するタンパク質、すなわちGFPをN末端に融合した改変型Baxタンパク質のN末端側にさらに血管新生している内皮細胞の表面受容体へのホーミング作用を有するホーミングシグナルペプチドを融合させた融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする遺伝子、および該融合タンパク質を含む癌細胞増殖抑制剤に関する。

背景技術

アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、Bax遺伝子は強力なアポトーシス誘導遺伝子として知られている。一方、アポトーシスを抑制する癌遺伝子として、Bcl-2遺伝子が知られており、Bcl-2タンパク質に相同性を示す多数のBcl-2ファミリーに属するタンパク質が知られている（Bcl-2、Bcl-XL等）。

アポトーシスあるいは広く細胞死を誘導する遺伝子の癌細胞への導入は抗癌治療の有望な方法であるが、近年Bcl-2、Bcl-XL等のBcl-2ファミリーのタンパク質が癌細胞において発現し、Baxタンパク質の細胞死誘導に対して拮抗作用を示すことが報告されている。Bcl-2ファミリータンパク質はBaxタンパク質のBH3と呼ばれる領域を介してBaxタンパク質と結合し、拮抗作用を示す。本発明者は、BH3領域を含むN末端を欠損させた第112位から192位のアミノ酸からなるN端側欠失Bax（ Δ NBax）について検討し、 Δ NBaxが細胞死誘導遺伝子Baxの細胞死誘導領域であることを報告した（Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 13; 243 (2):609-616）。 Δ NBaxをプロモーターの下流に連結し、細胞中で発現させると細胞死を誘導し、またBcl-XLと強発現させた場合でも細胞死誘導活性が阻害されることはなかった。この Δ NBaxをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび Δ NBaxペプチドを癌細胞増殖抑制に用い得ることについても報告されている（特開2002-355034号公報）。

一方、抗癌剤等の薬剤を細胞に特異的に導入するためのホーミングシグナルペ

プチドが現在種々研究されている。例えば、NGR、RGDと命名されたペプチドは血管新生している内皮細胞に選択的に作用することが知られており (Nat Med. 1999 Sep; 5 (9) :1032-1038)、癌組織中の血管新生している内皮細胞の表面受容体への特異的ホーミングシグナルペプチドとして使用できる可能性がある。

現在癌の治療は主に抗がん剤を投与する化学療法、放射線を患部に照射する放射線療法、抗癌細胞抗体を投与する免疫療法および遺伝子治療によっている。しかし、化学療法や放射線療法は各種の副作用が問題となっている。また、免疫療法は長期間の経過を要し、さらに遺伝子療法では遺伝子の患者に対する作用等安全性の面で開発に多大な労力を要する。このため分子量の大きな癌細胞に直接作用するタンパク質を標的部位に直接作用する癌治療法が望まれていたが、従来は癌細胞の増殖を強く抑制し、なおかつ癌細胞に特異的に作用するタンパク質であって、癌治療に確実に用い得るものはなかった。ΔNBaxを特異的に癌組織中の血管新生している内皮細胞の表面受容体に作用させることができれば、従来の方法の有する欠点を解消し、より効率的な癌細胞増殖抑制剤として利用されることが期待されていた。しかし、従来このような検討はされていなかった。また、ΔNBaxはそのままでもアポトーシス誘導活性を有するが、より強力なアポトーシス誘導活性をもつΔNBaxが望まれていた。

発明の開示

本願発明は、改変型BaxであるΔNBaxのアポトーシス誘導作用を増大させ、さらに血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用させることを目的とする。具体的には、ΔNBaxに血管新生している内皮細胞の表面受容体特異的なホーミングシグナルペプチドおよびグリーン蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) をホーミングシグナルペプチド、GFP、ΔNBaxの順で融合させた融合タンパク質およびそれをコードする遺伝子、ならびにそれらを含む抗癌剤を提供することを目的とする。

本発明者はΔNBaxの作用の検討を行うために、ΔNBaxのN末端側にΔNBaxの細胞内の局在の視覚化を容易にすべくGFPを融合した融合タンパク質を作製し、株化細胞に導入し細胞死誘導作用を調べた。その結果、驚くべきことにGFPと融合したΔNBaxの細胞死誘導作用が促進されていることを見出した。さらに、本発明

者はGFPと融合しアポトーシス誘導作用が促進された Δ NBaxを癌組織中の血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用させる方法について鋭意検討を行った結果、NGR、RGD等のホーミングシグナルペプチドをGFPのN末端側に融合させることにより、アポトーシス誘導作用が促進された Δ NBaxを血管新生している内皮細胞の表面受容体で特異的に作用させることができることを見出し本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用する細胞死誘導遺伝子を含む融合遺伝子であって、血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的なホーミングシグナルペプチド配列をコードする遺伝子、グリーン蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子およびヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxをコードする遺伝子をこの順番で融合させた融合遺伝子、

[2] ホーミングシグナルペプチド配列が、以下の(a)～(o)のペプチド配列からなる群から選択される[1]の融合遺伝子、

- (a) RGDペプチド配列、
- (b) NGRペプチド配列、
- (c) 配列番号7に示されるペプチド配列、
- (d) 配列番号8に示されるペプチド配列、
- (e) 配列番号9に示されるペプチド配列、
- (f) 配列番号10に示されるペプチド配列、
- (g) 配列番号11に示されるペプチド配列、
- (h) 配列番号12に示されるペプチド配列、
- (i) 配列番号13に示されるペプチド配列、
- (j) 配列番号14に示されるペプチド配列、
- (k) 配列番号15に示されるペプチド配列、
- (l) 配列番号16に示されるペプチド配列、
- (m) LDVからなるペプチド配列、
- (n) 配列番号17に示されるペプチド配列、および
- (o) 配列番号18に示されるペプチド配列

[3] ホーミングシグナルペプチド配列が、血管新生している内皮細胞へのホー

ミングシグナルペプチド配列であるRGDまたはNGRである、[2]の融合遺伝子、

[4] ヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxがヒトBAXのアミノ酸配列第112位から192位のアミノ酸配列からなる、[1]から[3]のいずれかの融合遺伝子、

[5] 融合遺伝子が以下の (p) または (q) のDNAからなる [1] から [3] のいずれかの融合遺伝子、

(p) 配列番号 3 または 5 で表わされる塩基配列からなるDNA

(q) (p) のDNAの塩基配列からなるDNAと相補的な配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNA

[6] [1] から [5] のいずれかの融合遺伝子を含む発現ベクター、

[7] 発現ベクターが無細胞系で融合遺伝子を発現し得る [6] の発現ベクター、

[8] [7] の発現ベクターを *in vitro* で発現させることを含む、[1] から [5] のいずれかの融合遺伝子がコードする融合タンパク質を製造する方法、

[9] 血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用する細胞死誘導タンパク質を含む融合タンパク質であって、血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的なホーミングシグナルペプチド配列、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) およびヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxタンパク質をこの順番で融合させた融合タンパク質、

[10] ホーミングシグナルペプチド配列が、以下の (a) ~ (i) のペプチド配列からなる群から選択される [9] の融合タンパク質。

(a) RGDペプチド配列、

(b) NGRペプチド配列、

(c) 配列番号 7 に示されるペプチド配列、

(d) 配列番号 8 に示されるペプチド配列、

(e) 配列番号 9 に示されるペプチド配列、

(f) 配列番号 10 に示されるペプチド配列、

(g) 配列番号 11 に示されるペプチド配列、

(h) 配列番号 12 に示されるペプチド配列、

(i) 配列番号 13 に示されるペプチド配列、

- (j) 配列番号 1 4 に示されるペプチド配列、
- (k) 配列番号 1 5 に示されるペプチド配列、
- (l) 配列番号 1 6 に示されるペプチド配列、
- (m) LDV からなるペプチド配列、
- (n) 配列番号 1 7 に示されるペプチド配列、および
- (o) 配列番号 1 8 に示されるペプチド配列

[1 1] ホーミングシグナルペプチド配列が、血管新生している内皮細胞へのホーミングシグナルペプチド配列である RGD または NGR である、[1 0] の融合タンパク質、

[1 2] ヒト Bax の BH3 領域を含む N 末端配列を除去した Δ NBax がヒト BAX のアミノ酸配列第 112 位から 192 位のアミノ酸配列からなる、[1 0] または [1 1] の融合タンパク質、

[1 3] 以下の (r) 若しくは (s) に示す [1 0] から [1 2] のいずれかの融合タンパク質、および

(r) 配列番号 4 または 6 で表されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質

(s) (r) の融合タンパク質アミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質

[1 4] [1 0] から [1 3] のいずれかの融合タンパク質を含む癌細胞増殖抑制剤、ならびに

[1 5] [1 4] の癌細胞増殖抑制剤であって、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) とヒト Bax の BH3 領域を含む N 末端配列を除去した Δ NBax タンパク質との融合により、ヒト Bax の BH3 領域を含む N 末端配列を除去した Δ NBax タンパク質の細胞死誘導作用が、単独のヒト Bax の BH3 領域を含む N 末端配列を除去した Δ NBax タンパク質の細胞死誘導作用に比べ増強されている癌細胞増殖抑制剤。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-081337 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、GFP- Δ NBax と Δ NBax の細胞死誘導活性の比較の結果を示す図である。

図 2 は、NGR-GFP- Δ NBax の細胞への取込みを示す写真である。

図 3 は、PI 陽性像を示す写真である。

図 4 は、担癌マウスを用いた NGR-GFP- Δ NBax の抗腫瘍効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本願発明は細胞死誘導遺伝子ヒト Bax の細胞死誘導領域部分を含む融合遺伝子およびその遺伝子がコードするタンパク質であり、該融合遺伝子はホーミングシグナルペプチドをコードする遺伝子および GFP (Green Fluorescent peptide) をコードする遺伝子を含み、5' 側からホーミングシグナルペプチドをコードする遺伝子、GFP をコードする遺伝子および Bax の細胞死誘導領域部分の順番で連結されている。

Bax の細胞死誘導領域部分は、Bax の BH1 領域、BH2 領域および BH3 領域のうち、Bax タンパク質の細胞死誘導作用に対して拮抗的に作用する Bcl-2 ファミリーのタンパク質が相互作用する BH3 領域を除いた部分である。BH3 領域は Bax の N 端側のアミノ酸配列の第 59 位から 73 位または 77 位をコア領域としており、Bax の細胞死誘導領域部分を含む改変型 Bax は Bax 遺伝子の 5' 端側の Bax タンパク質の N 端側のアミノ酸配列の少なくとも第 59 位から 73 位または 77 位に相当するヌクレオチドを欠失させたもの (Δ NBax) である。このような Bax の細胞死誘導領域部分を含む改変型 Bax として、Bax 遺伝子がコードする 192 アミノ酸からなる Bax タンパク質の第 112 位のアミノ酸から第 192 位のアミノ酸をコードする 243 塩基からなるポリヌクレオチドが好ましい。ヒト Bax 遺伝子の塩基配列を配列番号 1 に、ヒト Bax タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。この配列情報からヒト Bax cDNA を通常の遺伝子工学的技法により合成し、制限酵素等を用いて Δ NBax 遺伝子を得ることができる。例えば、Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 13; 243 (2):609-616 に記載の方法により取得できる。

本発明において、 Δ NBax 遺伝子は好適には配列番号 1 で表される塩基配列の第 334 位～第 576 位の塩基配列からなる DNA (Bax タンパク質の第 112 位～192 位のアミノ酸配列に相当) からなる遺伝子であるが、該 DNA に相補的な DNA とストリンジェ

ントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も含まれる。ストリンジेंटな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500～1000mM、好ましくは700mMであり、温度が50～70℃、好ましくは65℃での条件をいう。また配列番号1で表される塩基配列の第334位～第576位の塩基配列からなるDNAと、BLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しており細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も含まれる。さらに、配列番号1で表される塩基配列の第334位～第576位の塩基配列からなるDNAにおいて、1または複数の塩基が欠失、置換、付加され、かつ細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も含まれる。ここで、細胞死誘導作用とは、細胞に細胞死を起こさせる作用をいい、アポトーシスとネクローシスがある。例えば、細胞死の一形態であるアポトーシスにより細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層微絨毛の消失、細胞質の凝縮という特徴的な形態が現れる。Baxはもともとアポトーシス誘導（促進）タンパク質として発見されたが、Baxは細胞によってはネクローシスも引き起こすことが報告されている（Shinomura, N., et al. *Oncogene*, Vol.18:5703 (1999)）。本明細書において細胞死という場合、アポトーシスとネクローシスの両方が含まれている。タンパク質が細胞死誘導作用を有するか否かは、本願明細書の実施例4の方法に従いin vitroで決定することができる。

GFPは、クラゲ*Aequorea victoria*由来のgfp 10遺伝子によりコードされる*Aequorea victoria* 由来のものを用いることができる（(Prasher, D. C. ら (1992), "Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein", *Gene* 111:229-233)）。また、GFP遺伝子は市販のものも用いることができ、例えば市販のベクターpGreenlantern (Invitrogen LifeTechnology)（特表2000-503536号公報）に含まれるGFPをコードする遺伝子を用いることもできる。配列番号3の第40位から753位の塩基配列（配列番号5では、第28位から第741位）がGFPをコードする遺伝子の配列を示す。また、種々の改変型GFPが知られており、これらの改変型GFPを本発明のGFPとして用いることもできる。このような改変型GFPとしてEGFP (enhanced green fluorescent protein)、GFPuv、GFPmut3.1、BFP2

(すべてClonetech社から入手可能)、Venus (Nature Biotechnology January 2002 Vol. 20-1, 87-90)、S65Tが挙げられる。また、GFPの蛍光色の変異体である、EBFP (Blue)、ECFP (Cyan)、EYFP (Yellow) (すべてCLONTECH社から入手可能) も本発明のGFPとして使用できる。これらの改変型GFPは例えば、『実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座3 GFPとバイオイメージング』 宮脇敦史 編、2000年10月25日第1版第1刷発行、羊土社 に詳細に記載されており、この記載を参照して入手することができる。さらに、 Δ NBaxと融合させた場合に Δ NBaxの細胞死誘導作用をより促進するように改変されたGFPまたはその誘導体タンパク質も本発明のGFPに含まれる。

ホーミングシグナルペプチドとは、特定の細胞の表面に発現している受容体 (ホーミングシグナルペプチドのリガンド) と結合するペプチドをいい、体内に投与した場合に体液中を循環しそのホーミングシグナルペプチドが特異的に結合し得る受容体を表面に担持している標的細胞に到達し結合する。ホーミングシグナルペプチドのC末端側に薬剤となりうるタンパク質等と結合させた場合、ホーミングシグナルペプチドは該タンパク質を標的細胞に到達させ該タンパク質がその細胞内部に取り込まれる。本願発明では血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に結合することにより血管新生している内皮細胞に特異的に結合するペプチドを用いる。ホーミングシグナルペプチドとして、血管新生している内皮細胞のホーミングシグナルペプチド受容体に特異的に結合するNGRおよびRGD (Nat Med. 1999 Sep; 5 (9):1032-1038) を用いることができ、NGRおよびRGDの塩基配列は、それぞれ配列番号3の第4位から第33位および配列番号5の第7位から第21位の塩基配列で示される。NGRはAminopeptidase N (CD13) に結合し (Pasqualini, R., et al., Cancer Research (2000) 60: 722-727)、RGDはインテグリンの $\alpha v \beta 3$ および $\alpha v \beta 5$ に結合する (Koivunen, E., et al., Bio/Technology (1995) 13: 265-270) ことが知られている。ホーミングシグナルペプチドとしてNGRまたはRGDを用いた場合、ホーミングシグナルは血管新生している内皮細胞にホーミングするので、ホーミングシグナルペプチドと融合した細胞死誘導タンパク質が癌組織中の血管新生している内皮細胞の表面受容体に結合し該内皮細胞に取り込まれ癌組織中の血管新生している細胞の細胞死を引き起こす。癌組織中において癌細胞は血管新生している内皮細胞から生存・増殖に必要な養分を受け取って

いるので、これらの内皮細胞が細胞死を起こすことにより癌細胞は養分補給を受けられなくなり、癌細胞も死滅する。従って、ホーミングシグナルペプチドと融合した細胞死誘導タンパク質は、最終的に癌細胞を殺す効果がある。また、癌細胞によっては、癌細胞に脱分化した後に血管新生している内皮細胞が有している受容体を発現すると、この場合はホーミングシグナルペプチドが直接癌細胞に結合し、細胞死誘導タンパク質が癌細胞に取り込まれ癌細胞の細胞死を引き起こす。例えば、上述のNGRはカボシ肉腫由来のKS1767癌細胞に結合することが報告されている (Ellerby, H.M., et al. Nature medicine Vol. 5:1032 (1999)) ので、NGRを融合した本発明の融合タンパク質は直接癌細胞の細胞死を引き起こすことができる。但し、ホーミングシグナルペプチドはこれらのペプチドに限定されず、特定組織または器官の細胞に特異的に結合し得る種々のペプチドを、該組織または器官の癌組織へのホーミングのために用いることができ、以下のものが例示できる。

(1) 臓器特異的ホーミングシグナルペプチド (Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. (Nature 1996 vol. 380, pp. 364-366.))

(a) CLSSRLDAC (配列番号 7)、CNSRLHLRC (配列番号 8)、CENWWGDVC (配列番号 9)、WRCVLREGPAGGCAWFNRHRL (配列番号 10) の 4 個は脳を標的にする。

(b) CLPVASC (配列番号 11)、CGAREMC (配列番号 12) の 2 個は腎臓を標的にする。

(2) (関節の) 滑膜を標的にするホーミングシグナルペプチド (Lee, L. et al, (Arthritis Rheum 2002 vol. 46, pp. 2109-2120.))

CKSTHDRLC (配列番号 13)

(3) tumor lymphaticsを標的にするホーミングシグナルペプチド (Laakkonen, P., et al (Nature Medicine 2002 vol. 8, pp. 751-755))

CGNKRTRGC (配列番号 14)

(4) 血管新生している血管内皮細胞を標的にするホーミングシグナルペプチド (Asai, T., et al (FEBS Letter 2002 vol. 520, pp. 167-170.))

APRPG (配列番号 15)

(5) 細胞の表面に存在するインテグリン (インテグリンは総称で、複数の種類がある) に結合するペプチド (Koivunen, E., et al (Method in Enzymology 1994,

vol. 245, pp. 346-369.))

KQAGDV (配列番号 16)、LDV、KRLDGS (配列番号 17)、DGEA (配列番号 18) の4個が知られている。

また、癌抗原に結合する抗癌抗原抗体、または該癌抗原に結合し得るその抗体の断片も本発明においてホーミングシグナルペプチドと同様の作用を有するものとして用いることができる。

Baxの細胞死誘導領域を含む部分、GFPおよびホーミングシグナルペプチドは、N末端側からホーミングシグナルペプチド、GFPおよびBaxの細胞死誘導領域を含む部分の順番で融合させる。これは、ホーミングシグナルペプチドは、そのC末端側に存在するタンパク質を標的細胞に導入させることができるからであり、またBaxはそのC末端部分に膜融合部位があるからである。 Δ NBaxは単独でも細胞死誘導作用を有しているが、 Δ NBaxのN末端側にGFPを融合させることにより Δ NBaxの細胞死誘導作用が促進される。本発明においてGFPと Δ NBaxの融合タンパク質の促進された細胞死誘導作用とは、 Δ NBax単独で示す細胞死誘導作用よりも強い細胞死誘導作用をいう。GFPと Δ NBaxの融合タンパク質の細胞死誘導作用が促進されているかどうかは、 Δ NBaxタンパク質単独およびGFPと Δ NBaxタンパク質の融合タンパク質の両方を用いて本明細書の実施例1の(2)に記載の方法により両者の細胞死誘導作用を比較すればよい。例えば適当な宿主細胞集団にGFP遺伝子と Δ NBax遺伝子の融合遺伝子を含む適当なベクターおよび Δ NBax遺伝子のみを含む該ベクターをそれぞれ導入し、GFPと Δ NBaxの融合タンパク質および単独の Δ NBaxタンパク質を発現させた場合の生細胞率により細胞死誘導作用を測定した場合、GFPと Δ NBaxの融合タンパク質の細胞死誘導作用は、 Δ NBax単独での細胞死誘導作用よりも有意に強く、好ましくは1.5倍以上強く(Δ NBax単独での生細胞率がGFPと Δ NBaxの融合タンパク質の生細胞率の1.5倍以上)、さらに好ましくは2倍以上強く、特に好ましくは3倍以上強い。

ホーミングシグナルペプチドをコードする遺伝子、GFPをコードする遺伝子およびBaxの細胞死誘導領域部分をコードする遺伝子の融合は、通常の遺伝子組換えの手法により行うことができる。この際、適当な制限部位を導入して行うことができる。上述のようにホーミングシグナルペプチドをコードする遺伝子、GFPをコードする遺伝子およびBaxの細胞死誘導領域部分をコードする遺伝子の順で

融合させる。この際、融合する遺伝子の間にストップコドンが現れないようにする。融合する遺伝子の間の距離は限定されず、両者の間にリンカーが含まれていてもよい。ホーミングシグナルペプチドの活性および増大された細胞死誘導作用を有する融合タンパク質が翻訳されるためには、3つの遺伝子のオープンリーディングフレームを合わせるようにする。ホーミングシグナルペプチドとしてRGD、 Δ NBaxとしてヒトBaxタンパク質のアミノ酸配列の第112位から192位のアミノ酸配列からなる Δ NBaxを用いた場合の融合タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号3に、ホーミングシグナルペプチドとしてNGR、 Δ NBaxとしてヒトBaxのタンパク質のアミノ酸配列の第112位から192位のアミノ酸配列からなる Δ NBaxを用いた場合の融合タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号5に示す。該DNAに相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、 Δ NBax単独よりも促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500～1000mM、好ましくは700mMであり、温度が50～70℃、好ましくは65℃での条件をいう。また配列番号3または5で表される塩基配列からなるDNAと、BLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しておりコードする融合タンパク質が血管新生している内皮細胞に結合し、 Δ NBax単独よりも促進された細胞死誘導作用を有するDNAからなる遺伝子も含まれる。さらに、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAにおいて、1または複数の塩基が欠失、置換、付加され、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、 Δ NBax単独よりも促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子も含まれる。

ホーミングシグナルペプチドとしてRGDおよびNGR以外のものを用いた場合も、融合遺伝子全体として上述のように一部の塩基が欠失、置換、付加された配列を有する融合遺伝子も、用いたホーミングシグナルペプチドがその標的細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有する限り、本発明の融合遺伝子に含まれる。

このようにして作製した融合遺伝子を入手可能な適当な発現ベクターに組み込んで、発現させ、目的の融合タンパク質を回収、精製することができる。但し、

この際発現ベクターを宿主細胞に導入してタンパク質を発現させようとする場合、 Δ NBaxの細胞死誘導作用で、宿主細胞が死に易くなるので、無細胞系（セルフリーシステム）で発現させるのが望ましい。ここで無細胞系での発現とは、発現させようとする遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に導入することなく、in vitro で必要な試薬と混合し遺伝子を発現させることをいう (Spirin, A. S. et al, (1988) "A continuous cell-free translation system capable of production polypeptides in high yield" Science 242, 1162 ; Kim, D.M., et al., (1996) "A highly efficient cell-free protein synthesis system from E.coli" Eur. J. Biochem. 239, 881-886)。市販の無細胞発現キットを用いてタンパク質を発現させることができる。このようなキットとして例えば、Rapid Translation System (RTS) (Roche) や Expressway In Vitro Protein Synthesis System (Invitrogen) 等がある。この際、用いる発現ベクターは限定されないが、それぞれの無細胞系発現システムに適したベクターがあるのでそれを使用すればよい。前者のキット用発現ベクターとして、pIVEX2. 2bNdeが挙げられ、後者のキット用発現ベクターとして、pEXP1やpEXP2が挙げられる。

また、本発明の融合遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に組込んで発現させる細胞を用いる発現システムで本発明の融合遺伝子を発現させ、本発明の融合タンパク質を発現させる場合は、融合遺伝子が常に発現しては、細胞死誘導タンパク質の作用により宿主細胞が細胞死を起こして増殖できなくなってしまう。そのため、宿主細胞を充分増殖させてから、発現融合タンパク質が細胞壊死を引き起こすまでの間に融合遺伝子を発現させる為に、発現誘導システムを有する宿主細胞を用いる必要がある。発現誘導システムを有する宿主細胞を用いることにより、融合遺伝子を有する宿主細胞を充分増殖させた後に発現を誘導すれば、宿主細胞に細胞死が起こる前に十分な量の融合タンパク質を得ることができる。遺伝子を誘導的に発現し得るベクターとは、特定の処理を施すことにより組込まれた外来遺伝子の発現が誘導されるベクターをいう。例えば、特定の調節物質または温度条件で発現を誘導または抑制し得るプロモーターをベクターに組込むことにより誘導型発現ベクターを構築することが可能である。このようなプロモーターとして宿主細胞の培養培地中に誘導物質である薬剤を導入することにより特異的に誘導するプロモーターがある。例えばlacプロモーター、tacプロモーターは

イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で発現が誘導される。また、T7プロモーター系において、T7 RNAポリメラーゼDNA (T7 DNA1) がlacプロモーターの下流に連結されている場合においても、発現誘導物質としてIPTGが用いられる。さらに、trpプロモーターは3β-インドリルアクリル酸で発現が誘導される。発現誘導は、発現誘導物質の添加のみならず、培養温度を変化させることによって行ってもよい。λcItsリプレッサーおよびλPLプロモーターを含有する発現ベクターを有する組換え体を使用する場合、培養を、例えば約15～36℃、好ましくは約30～36℃で行い、λcItsリプレッサーの不活化による発現誘導を、例えば約37～42℃で行うのが好ましい。T7プロモーターの系においても、T7 RNAポリメラーゼDNA (T7 DNA1) がλPLプロモーターの下流に連結されている場合には、培養の温度を上昇させることにより、生成するT7ファージRNAポリメラーゼ1により特異的にT7プロモーターを作動させる。

さらに、宿主細胞として細胞死誘導タンパク質に耐性を有する細胞を用いてもよい。例えば、ΔNBaxに耐性の大腸菌等の耐性菌を用いればよい。このような細胞は、細胞をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の化学的変異原または紫外線等の物理的変異原により変異を起こさせ、細胞死誘導タンパク質に耐性を有する細胞をスクリーニングすることにより入手することができる。例えば、大腸菌に本発明の融合遺伝子を組み込み、該組換え大腸菌に人為的に遺伝子変異を起こさせた後に培養した場合、増殖する大腸菌はΔNBaxに対する耐性を有する大腸菌である。また、大腸菌に人為的に遺伝子変異を起こさせた後に、ΔNBaxを作動させたときに増殖する大腸菌はΔNBaxに対する耐性を有する大腸菌である。遺伝子に突然変異を起こさせる化学的変異原および物理的変異原ならびに変異原の利用法および用量は当業者に公知であるし、耐性を有する細胞をスクリーニングする方法も当業者ならば適宜設計することができる。

本発明の融合遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に導入して融合タンパク質を発現させる場合は以下のようにして行う。

ベクターとして、プラスミド、ファージ、ウイルス等の宿主細胞において複製可能である限りいかなるベクターも用いることができる。例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pKC30、pCFM536等の大腸菌プラスミド、pUB110等の枯草菌プラスミド、pG-1、YEp13、YCp50等の酵母プラスミド、λgt110、λZAPII等のフ

ァージのDNA等が挙げられ、哺乳類細胞用のベクターとしては、パキキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘導体等が挙げられる。ベクターは、複製開始点、選択マーカー、プロモーターを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列（ターミネーター）、リボソーム結合部位、ポリアダニル化シグナル等を含んでいてもよい。前述のように組込んだ遺伝子を誘導的に発現させる場合は、プロモーターとして発現誘導し得るものを用いる。

ベクターは、商業的に入手可能なものを使用することができ、例えば細菌性のものではpEF1、pPROEX (Invitrogen)、pQE30、pQE31、pQE32、pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pBluescriptII KS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T (Pharmacia)、pET3a、pET3b、pET3c、pET-11a (Novagen)、pUC118 (宝酒造)、真核性のものではpXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40 (Pharmacia) 等がある。

複製開始点として、大腸菌ベクターに対して、例えばColiE1、R因子、F因子由来のものが、酵母ベクターに対して、例えば2 μ mDNA、ARS1由来のものが、哺乳類細胞用ベクターに対して、例えばSV40、アデノウイルス、ウシバビローマウイルス由来のものを用いることができる。また、プロモーターとしてアデノウイルス又はSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrpプロモーター、ファージラムダP_L

プロモーター、酵母用としてのADH、PH05、GPD、PGK、AOX1プロモーター、蚕細胞用としての核多角体病ウイルス由来プロモーター等を用いることができる。

選択マーカーとして、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を、酵母用ベクターには、Leu2、Trp1、Ura3遺伝子等を、哺乳類細胞には、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いることができる。前述のように組込んだ遺伝子を誘導的に発現させる場合は、プロモーターとしてプロモーター下流の遺伝子の発現を誘導し得るものを用いる。

DNAのベクターへの導入は、任意の方法で行うことができる。ベクターは、種々の制限部位をその内部に持つポリリンカーを含んでいるか、または単一の制

限部位を含んでいることが望ましい。ベクター中の特定の制限部位を特定の制限酵素で切断し、その切断部位にDNAを挿入することができる。本発明の融合遺伝子を含む発現ベクターを適切な宿主細胞の形質転換に用いて、宿主細胞に前記融合遺伝子がコードするタンパク質を発現、産生させることができる。

宿主細胞としては、HB101、DH5、TG1、JM109、XL1-blue、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS等の大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌等の細菌細胞、アスペルギルス属菌株等の真菌細胞、パン酵母、メタノール資化性酵母等の酵母細胞、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞、CHO、COS、BHK、3T3、C127等の哺乳類細胞等が挙げられる。前述のように本発明の細胞死誘導融合タンパク質を含む細胞死誘導タンパク質に対する耐性細胞を用いてもよい。

形質転換は、塩化カルシウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、エレクトロポレーション等の公知の方法で行うことができる。

得られたリコンビナント融合タンパク質は、各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物がGST等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているタンパク質またはペプチドの性質を利用して精製することもできる。例えばヒスチジンが6個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジントグとの融合タンパク質として発現させた場合、ヒスチジントグを有するタンパク質はキレートカラムに結合するので、キレートカラムを用いて精製することができる、またGSTとの融合タンパク質として発現させた場合、GSTはグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

このようにして得られた発現産物はN末端からホーミングシグナルペプチド、GFPおよび Δ NBaxが連結した融合タンパク質である。ホーミングシグナルペプチドとしてRGD、 Δ NBaxとしてヒトBaxタンパク質のアミノ酸配列の第112位から192位のアミノ酸配列からなる Δ NBaxを用いた場合の融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号4に、ホーミングシグナルペプチドとしてNGR、 Δ NBaxとしてヒトBaxタ

ンパク質のアミノ酸配列の第112位から192位のアミノ酸配列からなる Δ NBaxを用いた場合の融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号6に示す。

本発明の融合タンパク質は、血管新生している内皮細胞に結合し、 Δ NBax単独よりも促進された細胞死誘導作用を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個、好ましくは1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

例えば、配列番号4または6で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号4または6で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号4または6で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。この場合のアミノ酸の欠失、置換、付加は融合タンパク質のホーミングシグナルペプチド、GFP、 Δ NBaxタンパク質のいずれの部分に生じてよい。

上記アミノ酸配列と、BLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しているものも含まれる。

ホーミングシグナルペプチドとしてRGDおよびNGR以外のものを用いた場合も、融合タンパク質全体として上述のように一部のアミノ酸が欠失、置換、付加された配列を有する融合タンパク質も、用いたホーミングシグナルペプチドがその標的細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有する限り、本発明の融合タンパク質に含まれる。

本発明は、上記融合タンパク質を有効成分として含む癌細胞増殖抑制剤組成物も含む。該組成物は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。また、本発明の癌細胞増殖抑制剤を癌部に直接投与してもよい。この癌細胞増殖抑制剤は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈

剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、融合タンパク質を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用してもよい。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。その投与量は、症状、年齢、体重および投与経路に依存するであろうから、医師の判断及び各患者の状況に応じて決定すべきである。有効用量は、*in vitro*における試験または*in vivo*の動物モデル試験系から導かれる。例えば、担癌マウスにおいて、本発明の融合タンパク質を0.2~0.4cm³の腫瘍に、2回直接投与した場合、500ng/ μ lの融合タンパク質を50 μ l投与することにより、マウスの腫瘍体積が減少する。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔実施例1〕 GFP- Δ NBaxの作製

(1) GFP- Δ NBaxの作製

GFP (Green Fluorescence Protein) の遺伝子 (DNA断片A) と Δ NBaxの遺伝子 (DNA断片B) を2段階PCR法で結合させた。

pGreenlantern (Invitrogen LifeTechnology) を鋳型にして5' 側プライマー Primer 1と3' 側プライマー Primer 2でDNA断片Aを増幅した。Primer 1の3' 側半分はGFP遺伝子の開始コドンからのセンスの塩基配列を含み、プライマーの5' 端に制限酵素ClaIの切断部位 (ATCGAT) を持っている。Primer 2の5' 側半分は Δ NBaxの遺伝子5' 側のアンチセンスの配列 (Ala112からSer118) を含み、Primer 3と相補的な塩基配列である。また、その3' 側半分はGFP遺伝子の終止コドンを除く3' 端のアンチセンスの塩基配列である。

pEF1BOS-Bax (Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 13; 243(2):609-616) を鋳型にしてPrimer 3とPrimer 4の組み合わせでDNA断片Bを増幅した。5' 側プライマー Primer 3は Δ NBax遺伝子の5' 端 (Baxのアミノ酸残基Ala112からSer11

8) のセンスの塩基配列である。3' 側プライマー Primer 4は Δ NBax遺伝子の終止コドンを含む3' 端 (Baxの3' 端) のアンチセンスの配列で、プライマーの5' 端には制限酵素XbaIの切断部位 (TCTAGA) を持っている。

PCR反応の詳細は以下のとおりである。

反応溶液 (溶液量 100 μ l) : 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, dATP, dCTP, dTTP, dGTP 各 0.2 mM

AmpliTaqGOLD: 2.5 U

一対のプライマー: Primer 1とPrimer 2 の組み合わせ、Primer 3とPrimer 4 の組み合わせ (各プライマー 1 μ M)

鋳型DNA: 100 ng

反応条件 1 : 94℃/10分 ; (94℃/30秒 ; 54℃/30秒 ; 72℃/1分) x 15サイクル ; 72℃/3分

反応後、増幅された二つのDNA断片 (A, B) は5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。次いで、上記PCR反応液 (25 μ l) にDNA断片A, B (それぞれ50 ng) を混合しAmpliTaqGOLDを使ってそれぞれの相補鎖を合成した。合成条件は以下の反応条件2のとおりとした。

反応条件2 : 94℃/10分 ; (94℃/30秒 ; 36℃-42℃/30秒 ; 72℃/1分) x 5サイクル ; 72℃/3分

反応後、Primer 1とPrimer 4 (最終濃度各 1 μ M) とAmpliTaqGOLD (2.5 U) を含むPCR反応液75 μ lを加え、以下の反応条件3によりPCRを実行した。

反応条件 1 : 94℃/10分 ; (94℃/30秒 ; 54℃/30秒 ; 72℃/1分) x 12サイクル ; 72℃/3分

960 bpのPCR産物を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素ClaIとXbaIで切断した。ホ乳類細胞発現ベクターpEF-LACABのClaIとXbaI切断部位の間にクローニングし、pEF-LACAB/GFP- Δ NBaxを得た。

(2) GFP- Δ NBaxと Δ NBaxの細胞死誘導活性の比較

Δ NBaxとGFP- Δ NBaxをホ乳類細胞で発現させるために、ベクターとしてpEF-LAC (Edamatsu, H., Kaziro, Y., Itoh, H. Inducible high-level expression vector for mammalian cells, pEF-LAC carrying human elongation factor 1 α)

a promoter and lac operator. Gene (1997) 187: 289-294) を用いた。ΔNBaxをコードする塩基配列（配列番号3の754位から999位）の5'端に開始コドンATGを付加したDNA断片をpEF-LACのEF1α プロモーター下流のmultiple cloning sites (XbaI切断部位) に挿入し、pEF-LAC-ΔNBaxを作製した。コントロールプラスミッドとしてはpEF-LACを用いた。

同じように、GFP-ΔNBaxをコードする塩基配列（配列番号3の40位から999位）を含むDNA断片をpEF-LACのEF1α プロモーター下流のmultiple cloning sites (ClaI切断部位とXbaI切断部位の間) にクローニングし、pEF-LAC-GFP ΔNBaxを作製した。

細胞死誘導活性は以下に記した様にJurkat細胞に上記のプラスミッドDNAを導入し、遺伝子導入された細胞の生存数をFlow cytometryで計数し、コントロールプラスミッド導入した細胞のそれと比較した。

pEF-LAC-ΔNBax 2 μgにGFPの発現プラスミッドpGreenLantern (Invitrogen Life Technologies) 1 μgを加えて、SuperFect transfection kit (Qiagen) を用いてJurkat細胞にco-transfectionした。方法はキットに添付されたマニュアルに従った。コントロールとしてpEF-LAC (空ベクター) 2 μgにpGreenLantern 1 μgを混合した溶液で同じようにco-transfectionした。加えたpGreenLanternの量が少ないので、pGreenLanternが導入された細胞にはpEF-LAC-ΔNBaxあるいはpEF-LACも導入されている。pEF-LAC-GFP ΔNBax については2 μgを上記同様SuperFect transfection kitを用いてJurkat細胞にtransfectionした。遺伝子導入された生細胞はGFPによる緑色の蛍光を示す。

transfection した後、細胞は10% FBSを含むRPMI1640 培地 (Invitrogen Life Technologies) で5% CO₂/95% Air, 37 °C (BIO-LABO 十慈フィールド (株)) の中で2日間培養し、Flow cytometry (COULTER社 EPICS ELITE ESP) で解析した。細胞をFoward scattering (FS) とSide scattering (SS) で正常の大きさの細胞50,000個を選別し（ゲート）、その中でGFPの緑色蛍光 (Em. 488 nm) を発する細胞数を計数した。

結果をコントロールpEF-LACでの生細胞数を100にして図1に示した。GFP ΔNBaxを遺伝子導入した生細胞数は、ΔNBax遺伝子導入した生細胞数にくらべて顕著

に少なく、GFP- Δ NBaxの細胞死誘導活性が上昇していることが確認された。

〔実施例2〕 RGD-GFP- Δ NBaxとNGR-GFP- Δ NBaxの作製

内皮細胞特異的ホーミングシグナル配列 (RGDおよびNGR) をGFP- Δ NBax融合遺伝子の5' 端に結合するために大腸菌細胞発現ベクターpPROEX1 (Invitrogen Life Technology) を用いた。ベクターpEF-LACABには3個、GFP- Δ NBax融合遺伝子のGFP遺伝子配列内 (nt. 166) に1個の制限酵素NcoI切断部位が存在する。pEF-LACAB/GFP- Δ NBaxをNcoIで4個のDNA断片に切断し、GFP- Δ NBax融合遺伝子 (全長960 bp) の3' 側794 bp (NcoI-XbaI) を含む約1.3 kbのDNA断片をpPROEX1のNcoI部位に順方向にクローニングし、pPROEX1/ Δ NGFP- Δ NBaxを得た。制限酵素NotIの切断部位がpEF-LACAB由来の配列 (XbaI部位の7塩基対下流) とクローニング断片3' 端 (3' 端NcoI部位) の下流のベクターpPROEX1配列に存在する。pPROEX1/ Δ NGFP- Δ NBaxをNotIで切断し、3' 端NcoI部位を含むpEF-LACAB由来の配列を除いて、pPROEX1/ Δ NGFP- Δ NBax/ Δ NotIを得た。

ホーミングシグナルペプチドRGDとNGRをそれぞれ Δ NGFP- Δ NBaxのN末端にPCR法で結合させた。Primer 5はNcoI切断部位に続きホーミングシグナルペプチドRGDをコードする塩基配列とGFP遺伝子の5' 端の塩基配列を含む。上記PCR反応液 (25 μ l) にPrimer 5とpEF-LACAB/GFP- Δ NBax (それぞれ20 ng) を混合しAmpliTaqGOLDを使ってPrimer 5の相補鎖を合成した。合成条件は以下の反応条件3のとおりとした。

反応条件3: 94 $^{\circ}$ C/10分; (94 $^{\circ}$ C/30秒; 44 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C/30秒; 72 $^{\circ}$ C/1分) x 6サイクル

反応後、Primer 6とPrimer 7 (最終濃度各 1 μ M) とAmpliTaqGOLD (2.5 U) を含むPCR反応液75 μ lを加え、以下の反応条件4によりPCRを実行した。

反応条件4: 94 $^{\circ}$ C/10分; (94 $^{\circ}$ C/30秒; 50 $^{\circ}$ C/30秒; 72 $^{\circ}$ C/1分) x 16サイクル

Primer 6はPrimer 5の5' 側半分の塩基配列を持ち、Primer 7はGFP遺伝子nt. 200 からnt. 217までのアンチセンスの塩基配列である。PCR産物を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素NcoIで切断した。本断片をNcoIで切断したpPROEX1/ Δ NGFP- Δ NBax/ Δ NotIにクローニングし、pPROEX1/RGD-GFP- Δ NBax/ Δ NotIを得た。本プラスミッドからホーミングシグナルペプチドRGDをN末端に持つGFP- Δ NBax (RGD-GFP- Δ NBax) が産生される。DNAシーケンシングによっ

て塩基配列を確認している。

Primer 8はNcoI切断部位に続きホーミングシグナルペプチドNGRをコードする塩基配列とGFP遺伝子の5' 端の塩基配列を含む。上記PCR反応液 (25 μ l) にPrimer 8とpEF-LACAB/GFP- Δ NBax (それぞれ20 ng) を混合しAmpliTaqGOLDを使ってPrimer 8の相補鎖を合成した。合成条件は反応条件3のとおりとした。反応後、Primer 9とPrimer 7 (最終濃度各 1 μ M) とAmpliTaqGOLD (2.5 U) を含むPCR反応液75 μ lを加え、上記反応条件4によりPCRを実行した。Primer 9はPrimer 8の5' 側半分の塩基配列である。PCR産物を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素NcoIで切断した。本断片をNcoIで切断したpPROEX1/ Δ NGFP- Δ NBax/ Δ NotIにクローニングし、pPROEX1/NGR-GFP- Δ NBax/ Δ NotIを得た。本プラスミッドからホーミングシグナルペプチドNGRをN末端に持つGFP- Δ Bax (NGR-GFP- Δ Bax) が産生される。DNAシーケンシングによって塩基配列を確認している。

〔実施例3〕 RGD-GFP- Δ NBax遺伝子とNGR-GFP- Δ NBax遺伝子のベクターpIVEX2. 2bNdeへの載せ替えとそれらの遺伝子産物の無細胞系タンパク質合成による産生

細胞系のタンパク質合成でNGR-GFP- Δ NBaxおよびRGD-GFP- Δ NBaxを産生させるためにプラスミッドベクターpIVEX2. 2bNde (Roche) にクローニングした。方法は実施例2と同じようにGFP遺伝子配列内のNcoIを利用して2段階に分けてクローニングした。

pPROEX1/NGR-GFP- Δ NBax/ Δ NotIをNcoIとXhoIで切断し、GFP- Δ NBax融合遺伝子 (全長960 bp) の3' 側794 bp (NcoI-XbaI) を含む822 bpのDNA断片を回収した。このDNA断片を予めNcoIとXhoIで切断したベクターpIVEX2. 2bNdeへクローニングし、pIVEX2. 2bNde/ Δ NGFP- Δ NBaxを得た。

実施例2と同じように、pPROEX1/NGR-GFP- Δ NBax/ Δ NotIとpPROEX1/RGD-GFP- Δ NBax/ Δ NotIをそれぞれ鋳型にしてPCR法でNGR-GFPおよびRGD-GFPの206-bp NcoI DNA断片を増幅した。DNA断片を回収した後、NcoI で処理したpIVEX2. 2bNde/ Δ NGFP- Δ NBaxにクローニングし、pIVEX2. 2bNde/NGR-GFP- Δ NBaxとpIVEX2. 2bNde/RGD-GFP- Δ NBaxを得た。これらのプラスミッドDNAをRoche社のマニュアルに従ってRTS500HYキット (Roche) に加え、細胞系タンパク質合成装置RTSプロテオマスター (Roche) でRGD-GFP- Δ NBaxタンパク質とNGR-GFP- Δ NBaxタンパク質を合成した。SDS-PAGE電気泳動においてPAG Mini (第一化学薬品) のゲルを使用し、2D銀

染色試薬II（第一化学薬品）を用いた銀染色法と常法のクマシーブリリアントブルー染色法によって合成されたタンパク質の確認とその定量（牛血清アルブミンをスタンダードとして使用）を行なった。

Primer 1. 5'-NNATCGATCCACCATGAGCAAGGGCGAG-3'（配列番号19）

Primer 2. 5'-CTGGCAAAGTAGAAAAGGGCCTTGACAGCTCGTC-3'（配列番号20）

Primer 3. 5'-GCCCTTTTCTACTTTGCCAG-3'（配列番号21）

Primer 4. 5'-NNTCTAGATCAGCCCATCTTCTTCCA-3'（配列番号22）

Primer 5. 5'-CCATGGCCTGCGATTGCCGTGGTGATTGTTTTGTGGTGG
TATGAGCAAGGGCGAGG-3'（配列番号23）

Primer 6. 5'-NNNNCCATGGCCTGCGATTGCC-3'（配列番号24）

Primer 7. 5'-TGGAAGCACTGCACGC-3'（配列番号25）

Primer 8. 5'-CCATGGCCTGCAACGGTCGTTGCGGTGGTATGAGCAAGG
GCGAGG-3'（配列番号26）

Primer 9. 5'-NNNNCCATGGCCTGCAACGGTC-3'（配列番号27）

〔実施例4〕

（1）培養細胞の培養

angiogenesisな状態にある細胞としてHUVEC（ヒト臍帯血管内皮細胞：三光純薬）、controlとしてHeLa細胞を使用した。mediumとしてHUVECではEBM-2（三光純薬）とその添加因子キット（血清、抗生物質含む：三光純薬）を使用した。HeLaではDMEM/F12（Invitrogen LifeTechnology）に10%FBS（牛胎児血清；三光純薬）、1%Penicillin-Streptomycin（LifeTechnology）を添加したものを使用した。

（2）蛋白の導入と細胞死活性の測定

96穴プレートにHUVEC (1.0×10^3 個/well)、HeLa (5.0×10^3 /well)を播種した。1 wellあたりのmedium量は200 μ lとした。NGR-GFP- Δ NBaxをRTS500HYキット（Roche）にて作製した。合成反溶液20 μ lを遠心分離（12000rpm, 4℃, 10分）した。上清を除去し、沈澱を20 μ lの溶解液（6M UREA, 0.15M NaCl, 20mM Hepes pH7.2）で再溶解した。室温にて10分静置後、遠心分離（12000 rpm, 4℃, 10分）し、その上清をNGR-GFP- Δ NBax試料として用いた。常法のSDS-PAGE電気泳動法にて、

既知量の牛血清アルブミンを標準にしてクマシーブリリアントブルー (CBB) による染色の度合いからNGR-GFP- Δ NBaxの濃度を決定したところ、その濃度は150 ng/ μ lであった。細胞の培地より抜き取った150 μ lに下記に示した量のNGR-GFP- Δ NBax試料を加えて混合し、抜き取った細胞のwellに加え戻した。蛋白質添加後24時間、48時間において細胞障害を判定するためにPI、ヘキスト33342をmedium中で5 μ Mとなるように加えた。蛍光顕微鏡 (LEICA DMIRB) にてPI陽性細胞数、ヘキスト陽性細胞数を計数した。それぞれのwellについて重なり合わない6視野 (100倍視野)、合計約1000個の細胞を計数した。

2種類の実験を行った。実験1では細胞としてHUVEC細胞のみを用いNGR-GFP- Δ NBax (750 ng)の代わりに溶媒である溶解液 (6 M UREA, 0.15M NaCl, 20mM Hepes pH7.2) を同体積 (5 μ l) 加えたものをコントロールとした。48時間後に評価した。実験2ではHUVEC細胞とHeLa細胞を用い、どちらの細胞にもNGR-GFP- Δ NBax (200 ngと60 ng)を加えた。24時間後に評価した。結果を表1に示す。表1に示すように48時間後の細胞死 (PI陽性率) は、血管新生している内皮細胞のモデル細胞HUVECにNGR-GFP- Δ NBax融合蛋白質を添加した場合に、同体積の溶媒だけを加えたコントロールより高頻度であった。また、HUVEC細胞にNGR-GFP- Δ NBax融合蛋白質を添加した場合、血管新生しないHeLa細胞にNGR-GFP- Δ NBax融合蛋白質を添加した場合よりも4～十数倍24時間後の細胞死の割合が高かった。

表1

実験1	48時間後の細胞死 (PI陽性率)		
	NGR-GFP- Δ NBax	コントロール (溶媒のみ添加)	無添加
HUVEC	42.4%	11.9%	8.5%
実験2	24時間後の細胞死 (PI陽性率)		
	NGR-GFP- Δ NBax	無添加	
	200 ng	60 ng	
HUVEC 細胞	13.1%	5.4%	1.4%
HeLa 細胞	3.2%	0.4%	0.4%

注：“無添加”は、何も加えない、かつ何も処理しない培地のみでの使用した細胞のPI陽性率である。

RGD-GFP- Δ NBax蛋白質とNGR-GFP- Δ NBax蛋白質が細胞に導入されていることを確認するために、4穴プレート (SonicSeal Slide; LAB-TEK 社) にHUVECは 1×10^5 個/well、HeLaは 5×10^4 個/wellを各々播種した。NGR-GFP- Δ NBax融合蛋白質200 ngを添加して、3時間後にそれぞれのmediumを交換し、PI (5 μ M) を加えた。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEWSV300 OLYMPUS) を用いてGFPとPIによる蛍光 (対物レンズ10倍) を観察した。図2に細胞中のGFPの存在を示す図を示す。図に示すように細胞死をおこしているHUVECでは細胞中にGFPの蛍光の存在が認められたが (死亡した細胞の核は赤色に見える)、HeLa細胞では認められず、ホーミングシグナルペプチドであるNGRにより融合タンパク質が血管新生を行っている内皮細胞のモデル細胞であるHUVEC細胞にのみ取り込まれていることが明らかになった。また、図3に細胞のPI染色像を示す。左図はHUVEC細胞をNGR-GFP- Δ NBax融合タンパク質で処理したもの、右図はHeLa細胞をNGR-GFP- Δ NBax融合タンパク質で処理したものを示す。図に示すようにHUVEC細胞でより多くのPI陽性細胞が認められた。図3の下には、HUVEC細胞をNGR-GFP- Δ NBax融合タンパク質で処理したものの一部分の拡大図を示すが、この拡大図中でPIで示される細胞 (PI陽性細胞) が死亡した細胞であり、Hで示される細胞 (ヘキスト陽性細胞) が生きている細胞である。

〔実施例5〕 担癌マウスを用いたNGR-GFP- Δ NBaxの抗腫瘍作用

HeLa細胞 (1×10^7 cells) をヌードマウスBALB/c-nu/nu Slc (♀, 8週齢) の皮下に移植して担癌マウスを作製した。腫瘍の大きさ (体積) は麻酔下 (ネンプタール) に精密ノギスで長径と短径を測定し、常法に従い (長径) \times (短径) $^2 \div 2$ の計算式で求めた。NGR-GFP- Δ NBaxをRTSHY500キット (Roche) で合成した。合成反応液100 μ lを遠心分離 (12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分) した。上清を除去し、沈澱を100 μ lの溶解液 (6 M UREA, 0.15 M NaCl, 20 mM Hepes pH7.2) で再溶解した。室温にて10分静置後、遠心分離 (12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分) し、その上清をNGR-GFP- Δ NBax試料として用いた。常法のSDS-PAGE電気泳動法にて、既知量の牛血清アルブミンを標準にしてクマシーブリリアントブルー (CBB) による染色の度合いからNGR-GFP- Δ NBaxの濃度を決定したところ、その濃度は500ng/ μ lであった。ネンプタール麻酔下に腫瘍の大きさを測定した担癌マウスに、NGR-GFP- Δ NBax試料50 μ

1ずつ2回腫瘍(0.2~0.4 cm³)に直接注入した(3匹)。コントロールとして溶解液(6 M UREA, 0.15 M NaCl, 20 mM Hepes pH7.2)だけを注入した(3匹)。1週間後に腫瘍の大きさを測定した(図4の1W; 白丸、NGR-GFP- Δ NBax試料投与; 黒丸、コントロール)。さらに、それぞれ2匹については、NGR-GFP- Δ NBax試料とコントロールとして溶解液(6 M UREA, 0.15 M NaCl, 20 mM Hepes pH7.2)を1回目と同様に50 μ lずつ2回腫瘍に直接注入し、1週間後に腫瘍の大きさを測定した(図4の2W)。図には個々の腫瘍の体積(白丸、NGR-GFP- Δ NBax試料投与; 黒丸、コントロール)の増加率を1回目の注入前の腫瘍体積に対する百分率(%)で示し、その平均値(水平のバー)も示した。1回目の注入後1週間での測定(1W)では、垂直のバーで標準偏差を示し、Student's t-testで統計処理を行なった結果、統計的有意差を得た。NGR-GFP- Δ NBax投与(1回、および2回)で腫瘍体積の減少が認められた。

産業上の利用可能性

実施例4の結果が示すように、ホーミングシグナルペプチド、GFPおよび Δ NBaxをこの順で融合させた融合タンパク質は、血管新生している細胞において特異的に強く細胞死を誘導した。このことは、融合タンパク質のホーミングシグナルペプチドの作用により融合タンパク質が血管新生している細胞に特異的に取り込まれ、GFPで細胞死誘導作用が増大した Δ NBaxの作用で、細胞死が誘導されたことを示す。また、実施例5の結果が示すように、担癌マウスにホーミングシグナルペプチド、GFPおよび Δ NBaxをこの順で融合させた融合タンパク質を投与すると、腫瘍体積の減少が認められた。この結果より、本発明の融合タンパク質が血管新生している癌細胞の死を特異的に強く誘導し得、癌細胞増殖抑制剤、すなわち抗癌剤として有用であることが判明した。

配列表フリーテキスト

配列番号7~18: ホーミングシグナルペプチド

配列番号19~27: プライマー

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1. 血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用する細胞死誘導遺伝子を含む融合遺伝子であって、血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的なホーミングシグナルペプチド配列をコードする遺伝子、グリーン蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子およびヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxをコードする遺伝子をこの順番で融合させた融合遺伝子。
2. ホーミングシグナルペプチド配列が、以下の (a) ~ (o) のペプチド配列からなる群から選択される請求項 1 記載の融合遺伝子。
 - (a) RGDペプチド配列、
 - (b) NGRペプチド配列、
 - (c) 配列番号 7 に示されるペプチド配列、
 - (d) 配列番号 8 に示されるペプチド配列、
 - (e) 配列番号 9 に示されるペプチド配列、
 - (f) 配列番号 10 に示されるペプチド配列、
 - (g) 配列番号 11 に示されるペプチド配列、
 - (h) 配列番号 12 に示されるペプチド配列、
 - (i) 配列番号 13 に示されるペプチド配列、
 - (j) 配列番号 14 に示されるペプチド配列、
 - (k) 配列番号 15 に示されるペプチド配列、
 - (l) 配列番号 16 に示されるペプチド配列、
 - (m) LDVからなるペプチド配列、
 - (n) 配列番号 17 に示されるペプチド配列、および
 - (o) 配列番号 18 に示されるペプチド配列
3. ホーミングシグナルペプチド配列が、血管新生している内皮細胞へのホーミングシグナルペプチド配列であるRGDまたはNGRである、請求項 2 記載の融合遺伝子。
4. ヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxがヒトBAXのアミノ酸配列第112位から192位のアミノ酸配列からなる、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の融合遺伝子。
5. 融合遺伝子が以下の (p) または (q) のDNAからなる請求項 1 から 3 のいずれ

か1項に記載の融合遺伝子。

(p) 配列番号3または5で表わされる塩基配列からなるDNA

(q) (p)のDNAの塩基配列からなるDNAと相補的な配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質をコードするDNA

6. 請求項1から5のいずれか1項に記載の融合遺伝子を含む発現ベクター。

7. 発現ベクターが無細胞系で融合遺伝子を発現し得る請求項6記載の発現ベクター。

8. 請求項7記載の発現ベクターを *in vitro* で発現させることを含む、請求項1から5のいずれか1項に記載の融合遺伝子がコードする融合タンパク質を製造する方法。

9. 血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的に作用する細胞死誘導タンパク質を含む融合タンパク質であって、血管新生している内皮細胞の表面受容体に特異的なホーミングシグナルペプチド配列、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) およびヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxタンパク質をこの順番で融合させた融合タンパク質。

10. ホーミングシグナルペプチド配列が、以下の(a)～(o)のペプチド配列からなる群から選択される請求項9記載の融合タンパク質。

(a) RGDペプチド配列、

(b) NGRペプチド配列、

(c) 配列番号7に示されるペプチド配列、

(d) 配列番号8に示されるペプチド配列、

(e) 配列番号9に示されるペプチド配列、

(f) 配列番号10に示されるペプチド配列、

(g) 配列番号11に示されるペプチド配列、

(h) 配列番号12に示されるペプチド配列、

(i) 配列番号13に示されるペプチド配列、

(j) 配列番号14に示されるペプチド配列、

(k) 配列番号15に示されるペプチド配列、

(l) 配列番号16に示されるペプチド配列、

(m) LDVからなるペプチド配列、

(n) 配列番号 17 に示されるペプチド配列、および

(o) 配列番号 18 に示されるペプチド配列

11. ホーミングシグナルペプチド配列が、血管新生している内皮細胞へのホーミングシグナルペプチド配列であるRGDまたはNGRである、請求項10記載の融合タンパク質。

12. ヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxがヒトBAXのアミノ酸配列第112位から192位のアミノ酸配列からなる、請求項10または11記載の融合タンパク質。

13. 以下の(r)若しくは(s)に示す請求項10から12のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

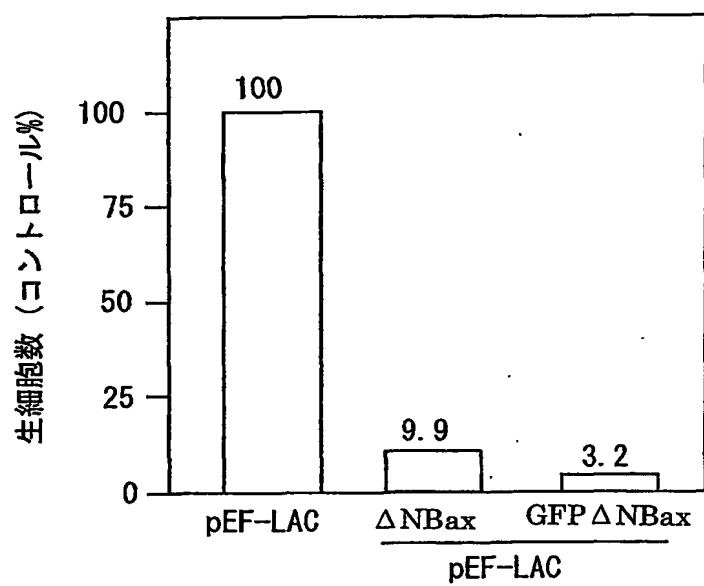
(r) 配列番号4または6で表されるアミノ酸配列を有する融合タンパク質

(s) (q)の融合タンパク質アミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ血管新生している内皮細胞に結合し、促進された細胞死誘導作用を有するタンパク質

14. 請求項10から13のいずれか1項に記載の融合タンパク質を含む癌細胞増殖抑制剤。

15. 請求項14記載の癌細胞増殖抑制剤であって、グリーン蛍光タンパク質(GFP)とヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxタンパク質との融合により、ヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxタンパク質の細胞死誘導作用が、単独のヒトBaxのBH3領域を含むN末端配列を除去した Δ NBaxタンパク質の細胞死誘導作用に比べ増強されている癌細胞増殖抑制剤。

図 1



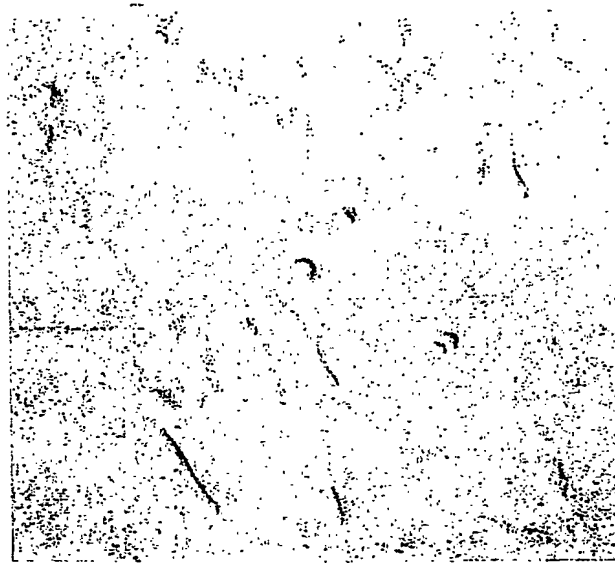
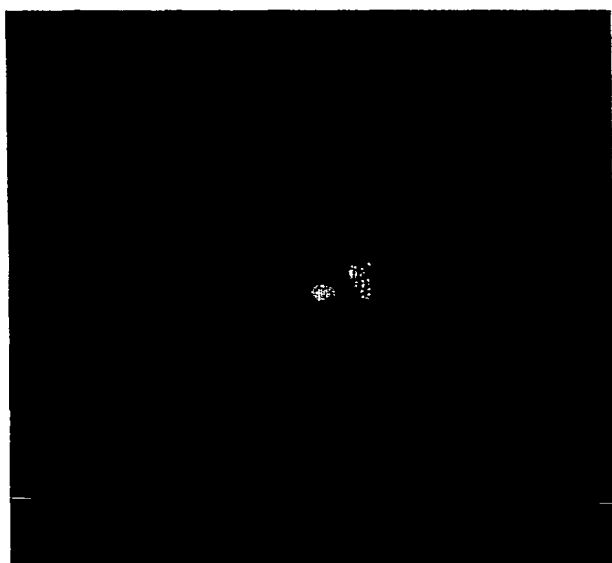
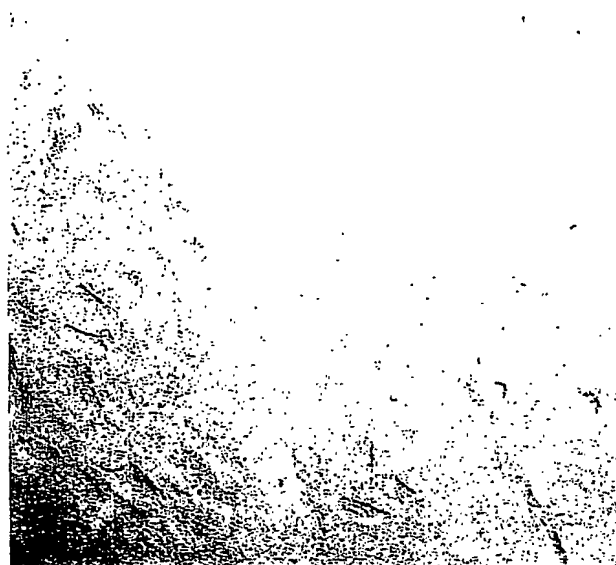
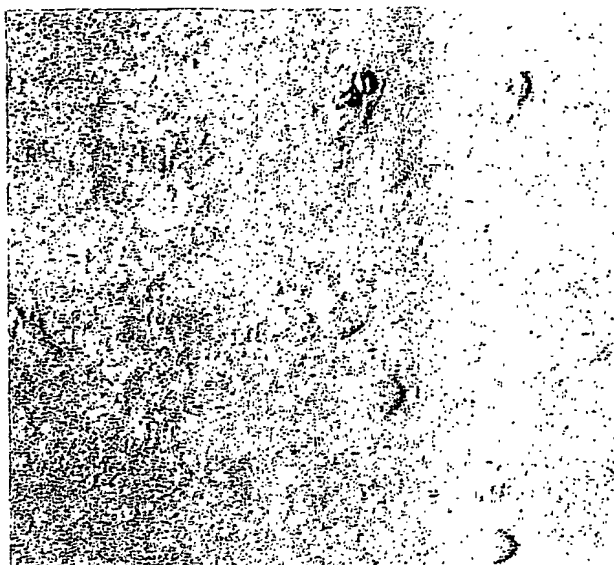


図 2

Huvec

Hela

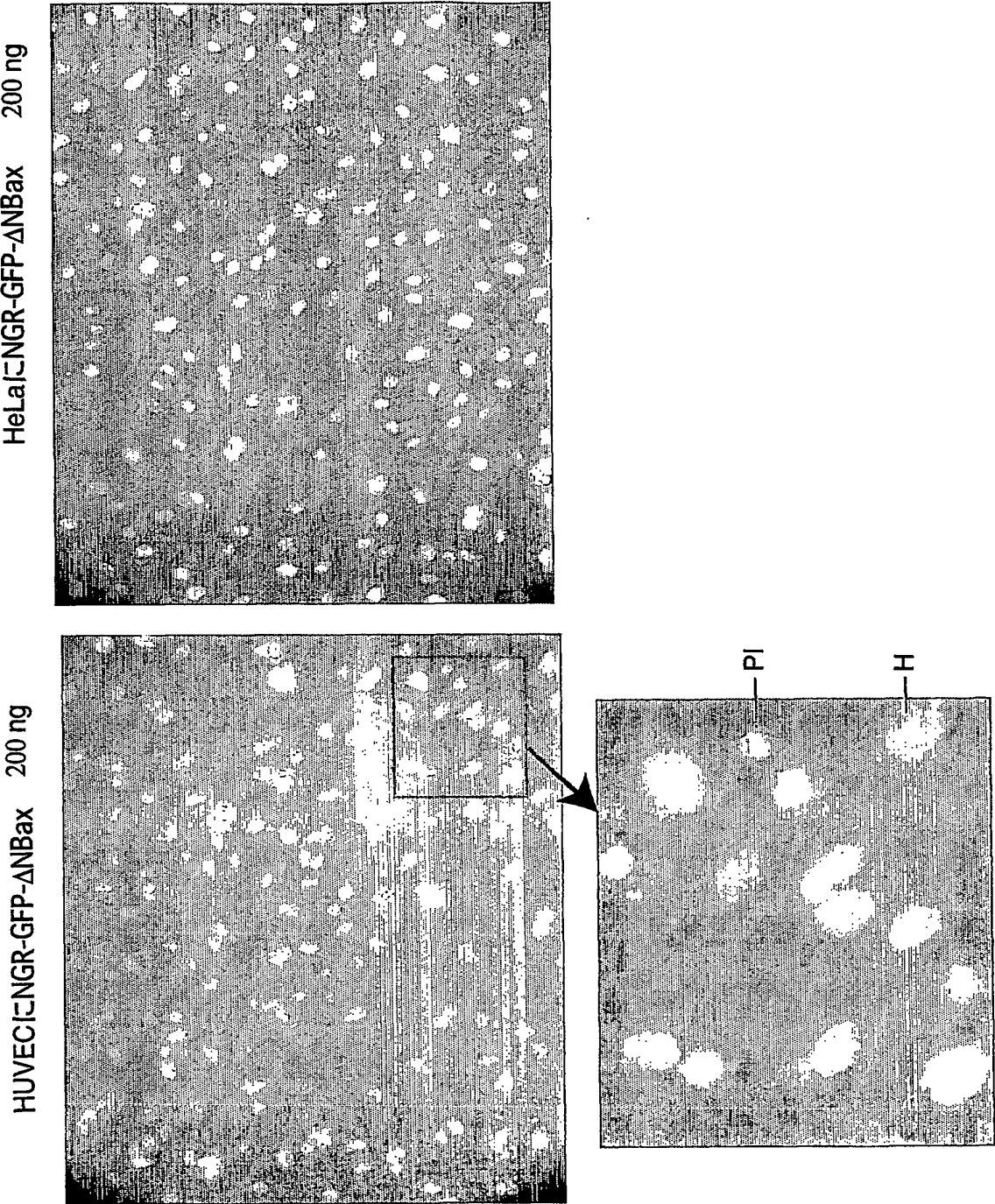
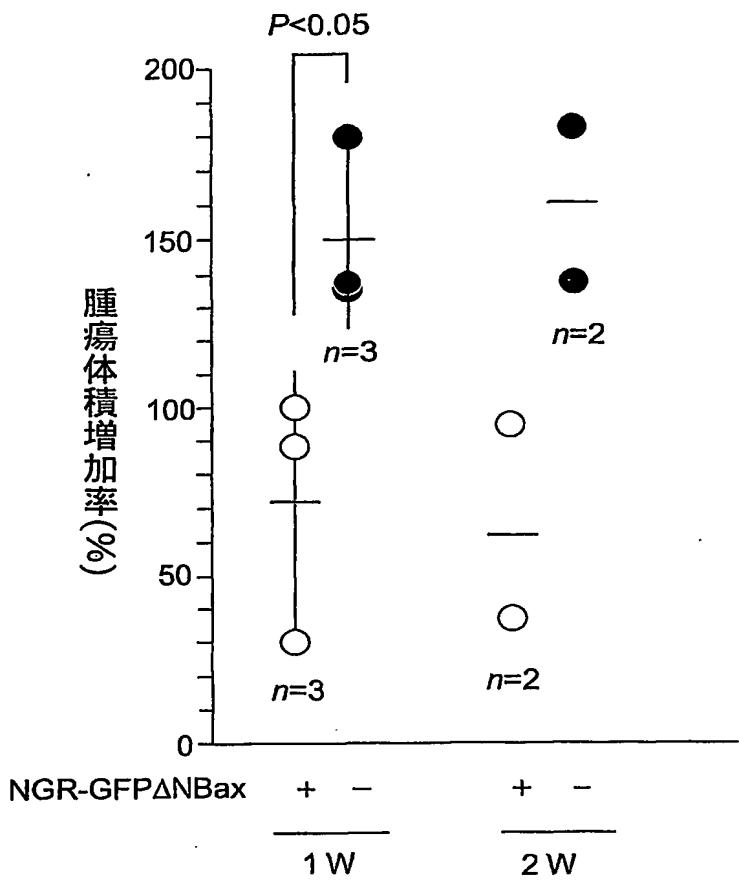


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON MEDICAL SCHOOL FOUNDATION

<120> Fusion cell death inducing gene specifically acting on
vascularizing endothelial cells

<130> PH-2011-PCT

<140>

<141>

<150> JP2003/081337

<151> 2003-03-24

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 579

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(579)

<400> 1

atg gac ggg tcc ggg gag cag ccc aga ggc ggg ggg ccc acc agc tct 48
Met Asp Gly Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Gly Gly Pro Thr Ser Ser

1	5	10	15	
gag cag atc atg aag aca ggg gcc ctt ttg ctt cag ggt ttc atc cag				96
Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly Phe Ile Gln				
20		25	30	
gat cga gca ggg cga atg ggg ggg gag gca ccc gag ctg gcc ctg gac				144
Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp				
35		40	45	
ccg gtg cct cag gat gcg tcc acc aag aag ctg agc gag tgt ctc aag				192
Pro Val Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys				
50		55	60	
cgc atc ggg gac gaa ctg gac agt aac atg gag ctg cag agg atg att				240
Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu Gln Arg Met Ile				
65	70	75	80	
gcc gcc gtg gac aca gac tcc ccc cga gag gtc ttt ttc cga gtg gca				288
Ala Ala Val Asp Thr Asp Ser Pro Arg Glu Val Phe Phe Arg Val Ala				
85		90	95	
gct gac atg ttt tct gac ggc aac ttc aac tgg ggc cgg gtt gtc gcc				336
Ala Asp Met Phe Ser Asp Gly Asn Phe Asn Trp Gly Arg Val Val Ala				
100		105	110	
ctt ttc tac ttt gcc agc aaa ctg gtg ctc aag gcc ctg tgc acc aag				384
Leu Phe Tyr Phe Ala Ser Lys Leu Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys				
115		120	125	

gtg ccg gaa ctg atc aga acc atc atg ggc tgg aca ttg gac ttc ctc 432

Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ile Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu

130

135

140

cgg gag cgg ctg ttg ggc tgg atc caa gac cag ggt ggt tgg gac ggc 480

Arg Glu Arg Leu Leu Gly Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly

145

150

155

160

ctc ctc tcc tac ttt ggg acg ccc acg tgg cag acc gtg acc atc ttt 528

Leu Leu Ser Tyr Phe Gly Thr Pro Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe

165

170

175

gtg gcg gga gtg ctc acc gcc tcg ctc acc atc tgg aag aag atg ggc 576

Val Ala Gly Val Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly

180

185

190

tga

579

<210> 2

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Gly Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Gly Gly Pro Thr Ser Ser

1

5

10

15

Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly Phe Ile Gln

20

25

30

Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp

	35		40		45	
Pro	Val	Pro	Gln	Asp	Ala	Ser
						Thr
						Lys
						Lys
						Leu
						Ser
						Glu
						Cys
						Leu
						Lys
	50				55	
						60
Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Leu	Asp
						Ser
						Asn
						Met
						Glu
						Leu
						Gln
						Arg
						Met
						Ile
	65				70	
						75
						80
Ala	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Ser
						Pro
						Arg
						Glu
						Val
						Phe
						Phe
						Arg
						Val
						Ala
						85
						90
						95
Ala	Asp	Met	Phe	Ser	Asp	Gly
						Asn
						Phe
						Asn
						Trp
						Gly
						Arg
						Val
						Val
						Ala
						100
						105
						110
Leu	Phe	Tyr	Phe	Ala	Ser	Lys
						Leu
						Val
						Leu
						Lys
						Ala
						Leu
						Cys
						Thr
						Lys
						115
						120
						125
Val	Pro	Glu	Leu	Ile	Arg	Thr
						Ile
						Met
						Gly
						Trp
						Thr
						Leu
						Asp
						Phe
						Leu
						130
						135
						140
Arg	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Trp
						Ile
						Gln
						Asp
						Gln
						Gly
						Gly
						Trp
						Asp
						Gly
						145
						150
						155
						160
Leu	Leu	Ser	Tyr	Phe	Gly	Thr
						Pro
						Thr
						Trp
						Gln
						Thr
						Val
						Thr
						Ile
						Phe
						165
						170
						175
Val	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Ala
						Ser
						Leu
						Thr
						Ile
						Trp
						Lys
						Lys
						Met
						Gly
						180
						185
						190

<210> 3

<211> 999

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (999)

<400> 3

atg gcc tgc gat tgc cgt ggt gat tgt ttt tgt ggt ggt atg agc aag 48

Met Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Gly Met Ser Lys

1

5

10

15

ggc gag gaa ctg ttc act ggc gtg gtc cca att ctc gtg gaa ctg gat 96

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp

20

25

30

ggc gat gtg aat ggg cac aaa ttt tct gtc agc gga gag ggt gaa ggt 144

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly

35

40

45

gat gcc aca tac gga aag ctc acc ctg aaa ttc atc tgc acc act gga 192

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly

50

55

60

aag ctc cct gtg cca tgg cca aca ctg gtc act acc ttc acc tat ggc 240

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr Tyr Gly

65

70

75

80

gtg cag tgc ttt tcc aga tac cca gac cat atg aag cag cat gac ttt 288

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe

85

90

95

ttc aag agc gcc atg ccc gag ggc tat gtg cag gag aga acc atc ttt 336

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe

100

105

110

ttc aaa gat gac ggg aac tac aag acc cgc gct gaa gtc aag ttc gaa 384
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu

115

120

125

ggt gac acc ctg gtg aat aga atc gag ctg aag ggc att gac ttt aag 432
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys

130

135

140

gag gat gga aac att ctc ggc cac aag ctg gaa tac aac tat aac tcc 480
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser

145

150

155

160

cac aat gtg tac atc atg gcc gac aag caa aag aat ggc atc aag gtc 528
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val

165

170

175

aac ttc aag atc aga cac aac att gag gat gga tcc gtg cag ctg gcc 576
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala

180

185

190

gac cat tat caa cag aac act cca atc ggc gac ggc cct gtg ctc ctc 624
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu

195

200

205

cca gac aac cat tac ctg tcc acc cag tct gcc ctg tct aaa gat ccc 672
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro

210

215

220

aac gaa aag aga gac cac atg gtc ctg ctg gag ttt gtg acc gct gct 720
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala

225	230	235	240	
ggg atc aca cat ggc atg gac gag ctg tac aag gcc ctt ttc tac ttt	768			
Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Leu Phe Tyr Phe				
245	250	255		
gcc agc aaa ctg gtg ctc aag gcc ctg tgc acc aag gtg ccg gaa ctg	816			
Ala Ser Lys Leu Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys Val Pro Glu Leu				
260	265	270		
atc aga acc atc atg ggc tgg aca ttg gac ttc ctc cgg gag cgg ctg	864			
Ile Arg Thr Ile Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu Arg Glu Arg Leu				
275	280	285		
ttg ggc tgg atc caa gac cag ggt ggt tgg gac ggc ctc ctc tcc tac	912			
Leu Gly Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly Leu Leu Ser Tyr				
290	295	300		
ttt ggg acg ccc acg tgg cag acc gtg acc atc ttt gtg gcg gga gtg	960			
Phe Gly Thr Pro Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe Val Ala Gly Val				
305	310	315	320	
ctc acc gcc tca ctc acc atc tgg aag aag atg ggc tga	999			
Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly				
325	330			

<210> 4

<211> 332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Gly Met Ser Lys
 1 5 10 15
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 20 25 30
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 35 40 45
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 50 55 60
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr Tyr Gly
 65 70 75 80
 Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 85 90 95
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 100 105 110
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 115 120 125
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 130 135 140
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 145 150 155 160
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 165 170 175
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 180 185 190
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 195 200 205
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 210 215 220

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Leu Phe Tyr Phe
 245 250 255
 Ala Ser Lys Leu Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys Val Pro Glu Leu
 260 265 270
 Ile Arg Thr Ile Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu Arg Glu Arg Leu
 275 280 285
 Leu Gly Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly Leu Leu Ser Tyr
 290 295 300
 Phe Gly Thr Pro Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe Val Ala Gly Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly
 325 330

<210> 5

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (987)

<400> 5

atg gcc tgc aac ggt cgt tgc ggt ggt atg agc aag ggc gag gaa ctg 48

Met Ala Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gly Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu

1

5

10

15

ttc act ggc gtg gtc cca att ctc gtg gaa ctg gat ggc gat gtg aat	96
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn	
20 25 30	
ggg cac aaa ttt tct gtc agc gga gag ggt gaa ggt gat gcc aca tac	144
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr	
35 40 45	
gga aag ctc acc ctg aaa ttc atc tgc acc act gga aag ctc cct gtg	192
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val	
50 55 60	
cca tgg cca aca ctg gtc act acc ttc acc tat ggc gtg cag tgc ttt	240
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe	
65 70 75 80	
tcc aga tac cca gac cat atg aag cag cat gac ttt ttc aag agc gcc	288
Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala	
85 90 95	
atg ccc gag ggc tat gtg cag gag aga acc atc ttt ttc aaa gat gac	336
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp	
100 105 110	
ggg aac tac aag acc cgc gct gaa gtc aag ttc gaa ggt gac acc ctg	384
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu	
115 120 125	
gtg aat aga atc gag ctg aag ggc att gac ttt aag gag gat gga aac	432
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn	

130	135	140	
att ctc ggc cac aag ctg gaa tac aac tat aac tcc cac aat gtg tac			480
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr			
145	150	155	160
atc atg gcc gac aag caa aag aat ggc atc aag gtc aac ttc aag atc			528
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile			
	165	170	175
aga cac aac att gag gat gga tcc gtg cag ctg gcc gac cat tat caa			576
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln			
	180	185	190
cag aac act cca atc ggc gac ggc cct gtg ctc ctc cca gac aac cat			624
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His			
	195	200	205
tac ctg tcc acc cag tct gcc ctg tct aaa gat ccc aac gaa aag aga			672
Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg			
210	215	220	
gac cac atg gtc ctg ctg gag ttt gtg acc gct gct ggg atc aca cat			720
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His			
225	230	235	240
ggc atg gac gag ctg tac aag gcc ctt ttc tac ttt gcc agc aaa ctg			768
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Leu Phe Tyr Phe Ala Ser Lys Leu			
	245	250	255

gtg ctc aag gcc ctg tgc acc aag gtg ccg gaa ctg atc aga acc atc 816
 Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ile

260

265

270

atg ggc tgg aca ttg gac ttc ctc cgg gag cgg ctg ttg ggc tgg atc 864
 Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu Arg Glu Arg Leu Leu Gly Trp Ile

275

280

285

caa gac cag ggt ggt tgg gac ggc ctc ctc tcc tac ttt ggg acg ccc 912
 Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly Leu Leu Ser Tyr Phe Gly Thr Pro

290

295

300

acg tgg cag acc gtg acc atc ttt gtg gcg gga gtg ctc acc gcc tca 960
 Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe Val Ala Gly Val Leu Thr Ala Ser
 305 310 315 320

ctc acc atc tgg aag aag atg ggc tga 987
 Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly

325

<210> 6

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gly Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu

1

5

10

15

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn

20	25	30
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr		
35	40	45
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val		
50	55	60
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe		
65	70	75
Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala		
85	90	95
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp		
100	105	110
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu		
115	120	125
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn		
130	135	140
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr		
145	150	155
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile		
165	170	175
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln		
180	185	190
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His		
195	200	205
Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg		
210	215	220
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His		
225	230	235
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Leu Phe Tyr Phe Ala Ser Lys Leu		
245	250	255
Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ile		

	260		265		270										
Met	Gly	Trp	Thr	Leu	Asp	Phe	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Trp	Ile
	275		280		285										
Gln	Asp	Gln	Gly	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Leu	Ser	Tyr	Phe	Gly	Thr	Pro
	290		295		300										
Thr	Trp	Gln	Thr	Val	Thr	Ile	Phe	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Ser
305			310		315									320	
Leu	Thr	Ile	Trp	Lys	Lys	Met	Gly								
	325														

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 7

Cys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Ala Cys

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 8

Cys Asn Ser Arg Leu His Leu Arg Cys

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 9

Cys Glu Asn Trp Trp Gly Asp Val Cys

1

5

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 10

Trp Arg Cys Val Leu Arg Glu Gly Pro Ala Gly Gly Cys Ala Trp Phe

1

5

10

15

Asn Arg His Arg Leu

20

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 11

Cys Leu Pro Val Ala Ser Cys

1

5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 12

Cys Gly Ala Arg Glu Met Cys

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 13

Cys Lys Ser Thr His Asp Arg Leu Cys

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 14

Cys Gly Asn Lys Arg Thr Arg Gly Cys

1

5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 15

Ala Pro Arg Pro Gly

1

5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 16

Lys Gln Ala Gly Asp Val

1

5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 17

Lys Arg Leu Asp Gly Ser

1

5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Homing peptide

<400> 18

Asp Gly Glu Ala

1

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (2)

<223> n is A, C, G or T

<400> 19

nnatcgatcc accatgagca agggcGag

28

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

ctggcaaagt agaaaagggc ctgtacagc tcgtc

35

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

gcccttttct actttgccag

20

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (2)

<223> n is A, C, G or T

<400> 22

nntctagatc agcccatctt cticca

26

<210> 23

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

ccatggcctg cgattgccgt ggtgattgtt tttgtggtgg tatgagcaag ggcgagg

57

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (4)

<223> n is A, C, G or T

<400> 24

nnnnccatgg cctgcgattg cc

22

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

tggaaaagca ctgcacgc

18

<210> 26

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

ccatggcctg caacggtcgt tgcggtggta tgagcaaggg cgagg

45

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (4)

<223> n is A, C, G or T

<400> 27

nnnnccatgg cctgcaacgg tc

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/62, C12P21/02, C07K19/00, C07K14/44, C07K14/47,
A61K38/16, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/62, C12P21/02, C07K19/00, C07K14/44, C07K14/47,
A61K38/16, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-355034 A (Japan Science and Technology Corp.), 10 December, 2002 (10.12.02), (Family: none)	1-15
Y	GU, J. et al., A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo., Oncogene 2002, Vol.21, No.31, pages 4757 to 4764	1-15
Y	LI, X.Y. et al., Overexpression of BLC-X _L underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells., Cancer Res., 2001, Vol.61, No.4, pages 1699 to 1706	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 April, 2004 (28.04.04)

Date of mailing of the international search report
18 May, 2004 (18.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003956

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/53342 A1 (BURNHAM INST.), 26 July, 2001 (26.07.01), & JP 2003-520808 A & EP 1250355 A1 & US 2001/0046498 A1 & AU 200129494 A & CN 1419565 A	1-15
Y	WO 00/42973 A2 (BURNHAM INST.), 27 July, 2000 (27.07.00), & JP 2002-535258 A & EP 1150701 A2 & AU 200033486 A	1-15
Y	ELLERBY, H.M. et al., Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides., Nat.Med., 1999, Vol.5, No.9, pages 1032 to 1038	1-15
P,X	AOKAGE, T. et al., Green fluorescent protein causes mitochondria to aggregate in the presence of the Bcl-2 family proteins., Biochem.Biophys. Res.Comm., 2004 February, Vol.314, No.3, pages 711 to 716	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003956

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/62, C12P 21/02, C07K 19/00, C07K 14/44, C07K 14/47, A61K 38/16, A61P 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/62, C12P 21/02, C07K 19/00, C07K 14/44, C07K 14/47, A61K 38/16, A61P 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-355034 A (科学技術振興事業団) 2002. 12. 10 (ファミリーなし)	1-15
Y	GU, J. et al. A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo. Oncogene 2002, Vol. 21, No. 31, p. 4757-4764	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 04. 2004

国際調査報告の発送日

13. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LI, X. Y. et al. Overexpression of BCL-X _L underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. Cancer Res. 2001, Vol. 61, No. 4, p. 1699-1706	1-15
Y	WO 01/53342 A1 (BURNHAM INST.) 2001. 07. 26 & JP 2003-520808 A & EP 1250355 A1 & US 2001/0046498 A1 & AU 200129494 A & CN 1419565 A	1-15
Y	WO 00/42973 A2 (BURNHAM INST.) 2000. 07. 27 & JP 2002-535258 A & EP 1150701 A2 & AU 200033486 A	1-15
Y	ELLERBY, H. M. et al. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. Nat. Med. 1999, Vol. 5, No. 9, p. 1032-1038	1-15
P, X	AOKAGE, T. et al. Green fluorescent protein causes mitochondria to aggregate in the presence of the Bcl-2 family proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Feb. , Vol. 314, No. 3, p. 711-716	1-15

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：